

異常血色素に関する研究 IV： ヘモグロビンの機能，特に酸素平衡曲線の測定について

川崎医科大学・生化学教室

青葉宏子・井内岩夫・日高和夫・島崎俊一

(昭和53年10月18日受理)

Studies on the abnormal hemoglobin IV : Measurement of oxygen equilibrium curve as a function of oxygen transport of hemoglobin.

Hiroko AOBA, Iwao IUCHI, Kazuo HIDAKA and Shunichi SHIMASAKI

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Oct. 18, 1978)

Abstracts

In order to compare the ability of oxygen transport between normal and abnormal hemoglobins, a convenient equipment for the determination of oxygen equilibrium curve was devised in our laboratory. The apparatus is a combined machine consist of a self-recording spectrophotometer and a Clark oxygen electrode. The cuvette is 1×1×4.5 cm in size and has a screwed cap with four holes. The two holes serve for pO₂ and reference electrode and the other two for inlet and outlet of N₂ gas blowing.

An aliquot of 4.0 ml of about 0.05 g/dl hemoglobin solution was safely used for the measurement.

The normal values of oxygen equilibrium curve obtained from 15 individuals were as follows: log P₅₀ (mmHg)=0.93~1.00 (pH 7.4), 1.12~1.18 (pH 7.0); Hill's n=2.5~3.2; Bohr effect ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) = -0.40~-0.50 and 2,3-DPG effect ($\Delta \log P_{50} / \Delta [2,3\text{-DPG}]$) calculated from the P₅₀ value difference between zero and 10 times high concentration of DPG per unit Hb was 0.033 respectively.

It is worthy of mentioning the P₅₀ values varies significantly even when the measuring condition changes very slightly. For example, a minor change of salt concentration, temperature, pH, and buffer constituents of the medium affected significantly to the P₅₀ value contrasting with other parameters: Hill's n, Bohr and 2,3-DPG effects.

Therefore, emphasis was made on the strict conditionings for measurement as well as the same runnings of normal control. The results of oxygen equilibrium curve of some abnormal hemoglobins were also given for discussion.

はじめに

血色素 (Hb) の最も大切な機能は組織に酸素を運搬することであり、この機能は呼吸器、循環器の機能とともに、i) Hb 濃度、ii) Hb の酸素親和性等により支配されていることも衆知の事実である。そして、Hb の酸素親和性は血液の pH、温度、塩類特に多磷酸体 (ATP、

2,3-DPGなど)等に強く影響される。さらに本研究課題の異常血色素症の場合には、Hb分子の異常のあり方によっても酸素親和性に変化を来し、酸素運搬能障害を惹起する。従って、異常血色素症の酸素運搬能の解析には、その構造の異常をつきとめるとともにこの種の機能検査が不可欠に大切である。そして、これまでに報告された異常血色素症270例中70例に、酸素親和性の亢進ないし減弱がみられ、貧血症、多血症の原因になっていることが知られている。従って、本症患者に遭遇したら異常血色素を有するためにどの程度酸素運搬能に障害を来たしているか、直接静脈血、動脈血について酸素親和性等を測定する事が最も実際的であるが、同時に、異常血色素自身がどの程度正常血色素の酸素運搬能と食い違いを示しているかを区分して測定することは、上述の成績を裏付けるために、また構造との関係を知るうえに極めて大切である。

私共は、こうした観点から血色素の酸素運搬能について検討してきたが、今回は主に後者の場合、即ち正常血色素と異常血色素の酸素親和性の違いを測定するため、自ら酸素平衡曲線測定装置を開発し、種々の改良のすえに満足に測定できる装置をこしらえて測定してきた。それをここに概説し、得られたいくつかの成績についても述べることにしたい。

装置、試薬ならびに被検試料液の調製

I) 装置

A) 酸素平衡曲線測定装置¹⁾

自作した測定装置の概要は図1に示す如くである。装置は、i) 測定部；島津自記式光電分光光度計(UV-200, 復光路型, 試料室の上蓋を箱を伏せた形に改造して内容積を大きくしたものに、a) ネジをつけた栓付角型セル(ユニオン技研), b) 循環水型恒温セルホルダー(自作), c) 試料液攪拌モーターを組み込んでいる。), ii) 記録部(吸光度測定, 酸素分圧測定, X-Yレコーダー(東亜電波工業)), および iii) 付属装置；a) 窒素ガス供給部(ガス加湿装置, ガス流速測定部), b) 循環恒温水槽(ラジオメーター社)から成る。

測定部のネジ付角型セルは1×1×4.5 cmの大きさのガラス製角型セルで、被検試料液4.0

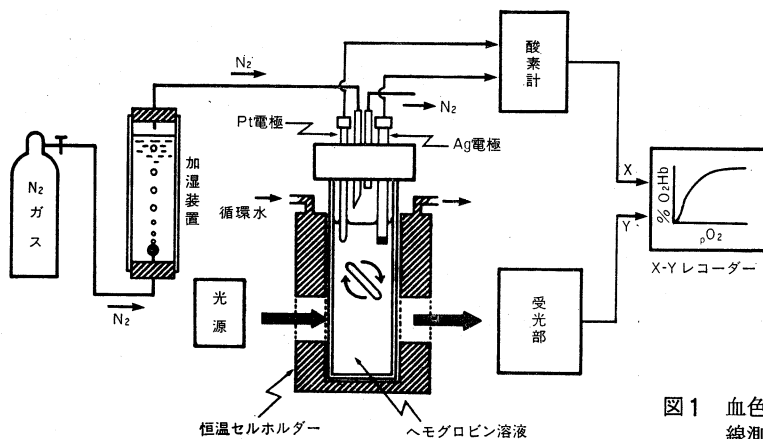


図1 血色素溶液の酸素平衡曲線測定原理図

ml を入れ、 pO_2 電極（ユニオン技研）を取り付けたネジ付栓で蓋をして密閉し、窒素ガスを吹き込んで、 pO_2 と吸光度の変化が同時に測定できるようになっている。また、セルの横壁面に磁気性の回転子（直径×長さ(cm)=0.3×0.9）が取り付けられていて、セルの外側からマグネチックモーターで回転子を回転、溶液の攪拌ができる。恒温セルホルダーは、光度計の試料室外部から恒温水を導き、試料液が一定温度に保たれるよう工夫されている。

記録部の pO_2 電極電位は、酸素計（ユニオン技研）で増幅され、吸光度とともにX-Yレコーダーに記録される。

付属部としての窒素ガス加湿装置は、試料に吹きつける窒素ガスによる被検液の乾燥を防止するためのもので、ボンベからの窒素ガスは、一旦 10×100 cm の水柱 2 本を通過する間に水で飽和されるようになっている。

測定原理は、先ず被検液をセルに入れ、攪拌しながら窒素ガスを吹き込んで、溶液中の酸素濃度を下げ、段階的に変化する pO_2 と吸光度とをX-Yレコーダーに記録してゆくものである。

b) I L-Blood gas analyser (21305型, I Lメーター社)

pO_2 電極の発生電位と酸素分圧の関係を校正するために使用する。

II) 試 薬

a) 0.05M ビス-トリス, 0.1M NaCl 緩衝液 (pH 7.0~7.8, 25°C):

ビス-トリス（半井化学, 生化学研究用特製試薬）10.46 g, NaCl（和光純薬, 特級）5.85 g を蒸留水に溶解して 1 l にする。この溶液の pH は約9.5である。次いで指定した pH の緩衝液 (pH=7.0, 7.4, 7.8) になるまで 6N-HCl を加えて調製する。

b) セファデックス G-25

セファデックス G-25（ファルマシア）を 0.1M NaCl に浮遊させ、静置後アスピレーターで微粒子を除去する。これを数回繰り返す、室温で約 3 時間膨潤させる。使用前に減圧法により脱気する。

c) 活性化ダウエックス 50W×8 樹脂 (200-400 mesh)

ダウエックス 50W×8（ダウケミカル社, 室町化学）をアセトンで洗浄後、蒸留水で膨潤させ、常法通り 4N-HCl 処理, 2N-NaOH 処理をして活性化する。酸型樹脂にしたのち、蒸留水で充分に洗浄し、中性に戻して保存する。

d) 2,3-ジホスホグリセリン酸 (2,3-DPG)

使用する 2,3-DPG はペンタシクロヘキシルアンモニウム塩として市販されている（シグマ）ので、まず試薬 50 mg を水 2.5 ml に溶解し、それに活性化したダウエックス 50W×8 を加えて、バッチ法によりペンタシクロヘキシルアンモニウムを除く²⁾。得られた 2,3-DPG 溶液の濃度はアルカリによる滴定、もしくは 2,3-DPG 測定用キット UV-35（シグマ）を用いて決定する。0°C 以下で保存する。

e) 窒素ガス (超高純度, 99.999%)

市販品窒素ガスを使用する。

Ⅲ) 被検溶液の調製

i) 2,3-DPG除去溶血液

溶血液は常法に従って作成し、溶血液中の2,3-DPGを除去した。即ち Benesch, R. らの方法³⁾を用いて、10 g/dl 溶血液 1 ml をセファデックス G-25 カラムに加え、次いで 0.1M NaCl 水溶液で展開し、2,3-DPGを除去した Hb 溶液 (3~4 g Hb/dl) を得た。

ii) 精製ヘモグロビン溶液

異常血色素等の分離精製は、セルロースアセテート膜電気泳動 (トリス-EDTA-ホウ酸緩衝液) で行なった。電気泳動後、各分画をハサミで切り出し、0.05M ビス-トリス、0.1M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) に漬して抽出した。濃度がうすく液量が多い場合は、冷室下 (4°C) コロジオンバッグを用いて減圧濃縮した。

項目 i), ii) の方法で得られた試料液は透析チューブに入れ、0.05M ビス-トリス、0.1M NaCl 緩衝液 (pH 7.4, 25°C) にむかって冷室下 (4°C) で一昼夜透析する (約 1/×3 回)。透析済の試料液は Hb 濃度を測定し、指定 pH の 0.05M ビス-トリス、0.1M NaCl 緩衝液で一定濃度に希釈し (10~15 μM)、0.1N 酢酸および 0.1N 水酸化ナトリウムを用いて正確に指定 pH に再調整する (25°C)。

測定方法

被検 Hb 試料 4.0 ml を回転子が入ったネジ付セルに入れ、蓋を閉めてセルホルダーに固定する。測定波長を 576 nm に合わせる。この波長における被検液吸光度が大きすぎて測定できない場合は、対照セルに濃度が近似した別の Hb 溶液を入れ、吸光度を測定範囲内におさめる。(目的は、この溶液における oxy Hb 型、deoxy Hb 型溶液の吸光度差であり、その絶対値ではない。) 約 2 分間攪拌の後、酸素計の読みが一定になるのを待って、X-Y レコーダー (X 軸: pO₂ 電極電位, Y 軸: 吸光度) に打点する。これが測定開始点 (Hb の酸素飽和度 (So₂)=100%) で、この時の酸素計の読みが、あらかじめ測定していた I L-メーターによる酸素分圧 (pO₂ mmHg) とみなされる。各測定点の pO₂ mmHg は、開始点の読みを基準にして計算する。Hb の酸素飽和度は Hb M 等を除き、開始点の吸光度を 100% とみなす。次いで、以後は攪拌しながら窒素ガスを試料液面上に約 60 秒吹きつけ、吹きつけ停止 (約 2 分)、打点を繰り返す。pO₂ mmHg, 吸光度が理論値 (pO₂: 0 mmHg, So₂: 0%) 付近まで下がったら測定を終了する。deoxy Hb 型吸光度の理論値は、同じ Hb 溶液に微量のヒドロサルファイトを添加して測定すれば得られる。あるいは、あらかじめ oxy Hb 型溶液の吸光度に対する oxy Hb 型と deoxy Hb 型の吸光度差 ΔE₅₇₆ を求めておき、検量線を描いておいて求めてもよい。

Bohr 効果を求める時は、pH 7.0, 7.4, 7.8 の Hb 試料溶液について、また 2,3-DPG

添加効果を求める時は、pH 7.4 の被検液に 2,3-DPG を Hb 濃度に対し 0, 1, 5, 10 倍の終濃度になるように加え、上述の操作を行なう。

得られたデータより、酸素飽和度 (S_{O_2}) %, $\log pO_2$ を計算し、グラフ用紙にプロットして曲線を描く。

成 績

正常人ヘモグロビン液の酸素平衡曲線は、図 2 に示すように 2,3-DPG 除去溶血液と精製ヘモグロビン溶液との間に酸素平衡曲線の差はみられず、測定した各 pH において、Hb の酸素半飽和時 ($S_{O_2}=50\%$) の溶液の酸素分圧 (P_{50} もしくは $\log P_{50}$ 値)、 $S_{O_2}=50\%$ における曲線の勾配 (Hill の n 値; ヘム間相互作用)、単位 pH 変動時の P_{50} の変化量 (Bohr 効果; $\Delta \log P_{50}/\Delta pH$) ともほぼ同じ値が得られた。また、測定した 15 例の正常血色素例について、 $\log P_{50}$ 値、Hill の n 値、Bohr 効果の変動を調べたところ、 $\log P_{50}$ (mm Hg) は pH 7.4 で 0.93~1.00, pH 7.0 で 1.12~1.18, Hill の n 値は 2.5~3.2, Bohr 効果は -0.40~-0.50

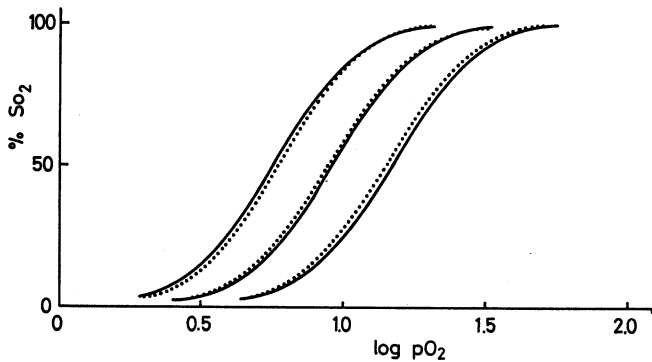


図 2 正常血色素の各種 pH (7.0, 7.4, 7.8) における酸素平衡曲線。
—: 2,3-DPG 除去溶血液, ...: 電気泳動法で精製した Hb A 溶液。25°C, 0.05M ビストリス, 0.1M NaCl 緩衝液。

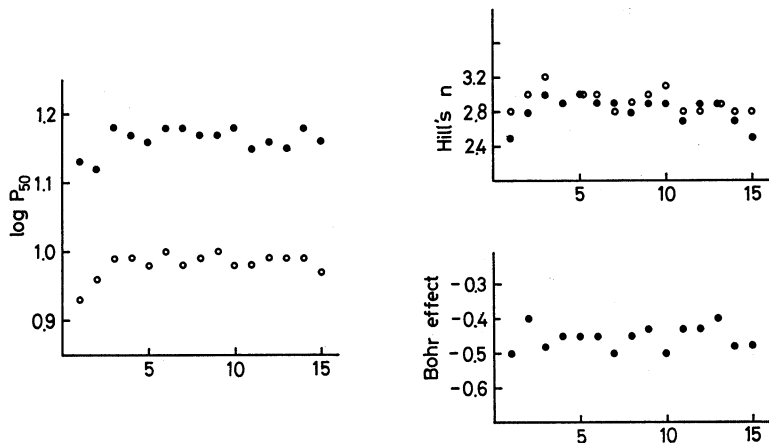


図 3 2,3-DPG 除去正常人血色素溶液 (15 例) の $\log P_{50}$, Hill の n 値, Bohr 効果。25°C, 0.05M ビストリス, 0.1M-NaCl 緩衝液。 $\log P_{50}$, Hill's n については・点: pH 7.0, ○点: pH 7.4。

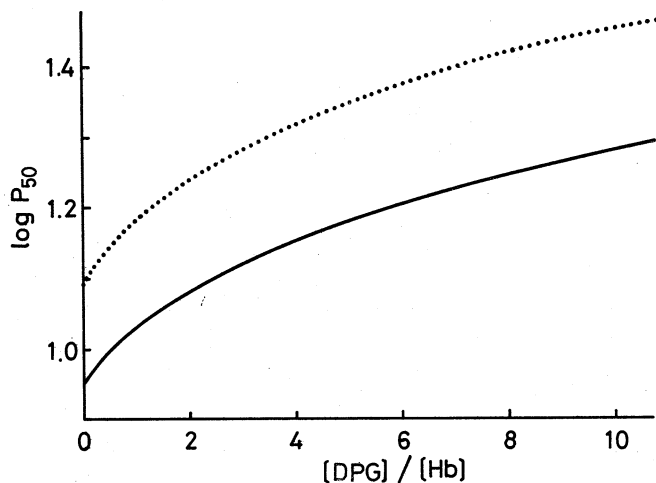


図4 正常人溶血液 (15 μ M) の2,3-DPG効果。
—: 温度 25°C の場合,
...: 37°C の場合を示す。

/4pH の範囲にあった (図3)。

2,3-DPG 添加による酸素親和性の減弱, つまり2,3-DPG 効果は図4に示す如くであった。これより, 2,3-DPG 添加濃度が増大するにつれて P_{50} 値の増大, 即ち酸素親和性の低下がみられた。測定に用いた試料液の Hb 濃度は 15 μ M であり, 2,3-DPG 濃度倍数がゼロと10の2点間の変位量から, 2,3-DPG 効果 ($\Delta \log P_{50} / \Delta [2,3\text{-DPG}]$ 値) を計算すると全例に於て, 測定温度および 0.1M NaCl の存在に無関係に, 温度 37°C で 0.036, 25°C で 0.033となりほぼ同じであった。

考 按

私共の装置の特徴は, 微量の血液試料で測定をすませるため, 普通の角型セル (1×1×4.5 cm) に微量 pO_2 電極, 参照電極, 窒素ガス吹き込み口およびその出口等を, ネジで密栓できるセルの蓋に取り付け, 更に試料液が完全に攪拌するように回転子をセルの横壁にとりつけて液を縦に攪拌するようにした点で, これにより安定した測定ができるようになった。

また, Hb 試料液調製のための緩衝液としては, これまで主に磷酸緩衝液¹⁾⁷⁾, トリス緩衝液⁴⁾, ビス-トリス緩衝液⁵⁾⁹⁾¹¹⁾の使用が報告されているが, 私共は pO_2 測定に影響する磷酸イオンを含む磷酸緩衝液の使用を避け, 更に pK 値が指定 pH に近いビス-トリス緩衝液を用いた。しかも, ビス-トリス緩衝液はそれ自身温度変化による pH 変動が大きいので, 25°C で調製しその温度で測定に使用した。緩衝液中には NaCl が 0.1M の割合で含まれているが, これは Hb の pO_2 値に塩効果が多少影響しても, 異常血色素例の場合, 特に deoxy Hb 型となった時に不安定となり沈殿を生じる例も多いので, それを防止する安定化剤として使用した。

Hb 試料液の測定中の安定化には, 上述の条件以外に Hb の濃度および測定温度も大切に

あった。即ち、Hb 濃度は 5~15 μM (40~100 mg Hb/dl) 程度のもので使用し得たが、5 μM 以下の場合、窒素ガス吹き込みによる脱酸素化は容易であるが Hb 試料液が変性しやすい。反対に、濃い Hb 溶液を用いると溶液の安定性は確保されるが脱酸素しにくく時間を要した。普通 Hb 濃度が 10~15 μM の場合、測定精度が十分に確保され、30~60分で測定が完了した。

測定温度も酸素平衡曲線測定に強く影響した。これは、Hb の P_{50} 値そのもの、緩衝液、および気体の溶解度等が温度依存性であるからであろう。特に測定温度が試料調製時の温度より高い場合、溶解していた気体が液中に微小気泡として析出してセル内壁に付着し、吸光度測定を妨害することが多かった。

測定した P_{50} ($\log P_{50}$) 値の絶対値について、過去に報告された成績をみると表 1 に示した

表 1 文献による Hb の酸素平衡曲線に関する各種パラメーター値

$\log P_{50}$	Hill's n	Bohr effect	pH	Temp.	Buffer	References
0.75	2.8	-0.55	7.4	20°C	0.1M Phosphate	Imai, K. et al ¹⁾
0.97	2.9		7.0	20	"	
1.10	2.8		6.5	20	"	
0.45	2.5		7.0	20	0.1M NaCl	Benesch, R. et al ³⁾
0.26	2.9	-0.60	7.4	20	0.05M Tris	Moo-Penn, W.F. et al ⁴⁾
0.30	2.7		7.1	25	0.05M Bis-tris	Gacon, G. et al ⁵⁾
0.34	2.8		7.2	10	0.05M Bis-tris, 0.1M NaCl	Benesch, R.E. et al ⁶⁾
0.86	2.9	-0.28	7.4	20		
0.97	2.9		7.0	20	0.1M Phosphate	Imamura, T. et al ⁷⁾
1.02	2.8		6.4	20		
0.64	3.0	-0.52	7.5	20	0.1M Phosphate+NaCl (ionic strength=0.2)	Imai, K. et al ⁸⁾
0.90	3.0		7.0	20		
1.11	2.8		6.4	20		
0.28	2.5		7.4	25	0.05M Bis-tris	Imai, K. ⁹⁾
1.06	2.7	-0.49	7.22	37	0.1M KCl	Kilmartin, J.V. ¹⁰⁾
0.37	2.8		7.4	25	0.05M Bis-tris	Imai, K. ¹¹⁾
0.77	2.7		7.4	25	0.05M Bis-tris, 0.1M NaCl	
1.15	2.8		7.15	37	不明	Thillet, J. et al ¹²⁾

如く、測定時の温度、pH、緩衝液の種類と濃度、塩濃度等の僅かの変化で著しい変動があり、それらを一義的に比較することは困難で、また意味も少ないように思われる。他方、Hill の n 値、Bohr 効果については、それぞれ 2.8 前後、-0.5 前後とほぼ一定の値を示しており、これらは私共の測定値とも一致した。従って、異常血色素について調べる場合には、同じ条件下で作成したコントロールについて同時に測定を行ない、コントロールに対する異常の有無を調べることに、および測定条件の併記が大切である。

私共がこれまでに測定した異常血色素のうち、コントロールと比較して著しい差がみられた

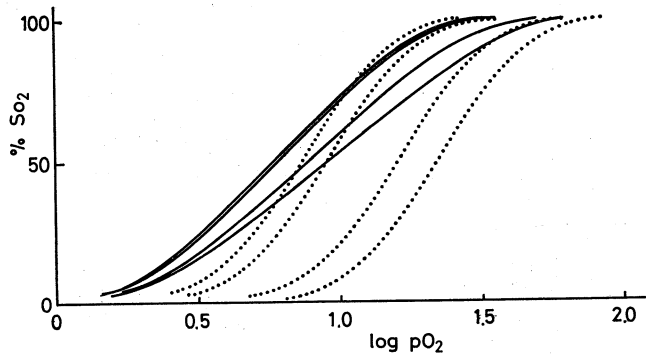


図5 Hb Hyde Park の酸素平衡曲線。—: Hb Hyde Park, ...: 同じ患者の Hb A 分画を示す。37°C, 0.05M トリス緩衝液。Hb Hyde Park は $\alpha_2^A(\text{heme-Fe}^{2+})_2 \beta^M(\text{heme-Fe}^{2+}) \beta^M(\text{no heme})$ である。対照の Hb A に比べ、 P_{50} 値, Hill's n 値, Bohr 効果の減弱等に注目せよ。

Hb Hyde Park についてその結果を図5に示した¹³⁾。著明な P_{50} の減少, Hill の n 値の減少, Bohr 効果の減少がみられる。その他測定した異常血色素, Hb Asabara (=Hb G Taichung)¹⁴⁾, Hb Hoshida¹⁵⁾=Hb Chaya, Hb Okayama=Hb Ube-4¹⁶⁾ 等については, その酸素平衡曲線とコントロールとの間に差異は認められなかった。

結 論

異常血色素の酸素運搬能を正常血色素のそれと比較対照するため, 酸素平衡曲線測定装置を自作し, その装置と測定成績について報告した。装置は自記分光光度計と酸素分圧測定器とを組み合わせたもので, 普通の大きさのネジ付角型セル (1×1×4.5 cm) に, pO_2 電極, 窒素ガスの吹き込み, 吹き出し口, 攪拌装置等を取り付け, 被検試料が少量 (Hb 濃度 0.04~0.10 g/dl のもの 4.0 ml) ですませられるようにしてある。

この装置および指定した方法による正常値は, $\log P_{50}$ (mm Hg)=0.93~1.00 (pH 7.4), 1.12~1.18 (pH 7.0), Hill の n 値=2.5~3.2, Bohr 効果 ($\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$)=-0.40~-0.50, 2,3-DPG 効果 ($\Delta \log P_{50}/\Delta(2,3\text{-DPG})$)=0.033 であった。また, Hill の n 値, Bohr 効果, 2,3-DPG 効果についてはそれ程でないが, P_{50} 値は温度, pH, 緩衝液組成等の微妙な差で有意に変動するので, 測定条件の厳守とコントロールをたてた測定が必要であることを強調した。

また, いくつかの異常血色素の測定例について成績を述べた。

References

- 1) Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Watari, H., Hirata, W. and Kuroda, M.: Studies on the function of abnormal hemoglobins. I. An improved method for automatic measurement of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, 200: 189-196, 1970.
- 2) Bunn, H. F., Briehl, R. W., Larrabee, P. and Hobart, V.: The interaction of 2,3-

- diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J. Clin. Invest.*, 49: 1088-1095, 1970.
- 3) Benesch, R., Benesch, R. E. and Yu, C. I.: Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 59: 526-532, 1968.
 - 4) Moo-Penn, W. F., Jue, D., Johnson, M., Wilson, S., Therrell, B. and Schmidt, R. M.: Hemoglobin Tarrant: α 126 (H 9) Asp \rightarrow Asn. A new hemoglobin variant in the $\alpha_1\beta_1$ contact region showing high oxygen affinity and reduced cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta*, 490: 443-451, 1977.
 - 5) Gacon, G., Belkhodja, O., Wajcman, H. and Labie, D.: Structural and functional studies of Hb Rothschild β 37 (C 3) Trp \rightarrow Arg. A new variant of the $\alpha_1\beta_2$ contact. *FEBS Lett.*, 82: 243-246, 1977.
 - 6) Benesch, R. E., Benesch, R. and Yu, C. I.: The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry*, 8: 2567-2571, 1969.
 - 7) Imamura, T., Fujita, S., Ohta, Y., Hanada, M. and Yanase, T.: Hemoglobin Yoshizuka (G 10 (108) β Asparagine \rightarrow Aspartic acid): a new variant with reduced oxygen affinity from a Japanese family. *J. Clin. Invest.*, 48: 2341-2348, 1969.
 - 8) Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Shibata, S., Miyaji, T. and Matsumoto, K.: Studies on the function of abnormal hemoglobins. II. Oxygen equilibrium of abnormal hemoglobins: Shimonoseki, Ube II, Hikari, Gifu, and Agenogi. *Biochim. Biophys. Acta*, 200: 197-202, 1970.
 - 9) Imai, K.: Analyses of oxygen equilibria of native and chemically modified human adult hemoglobins on the basis of Adair's stepwise oxygenation theory and the allosteric model of Monod, Wyman, and Changeux. *Biochemistry*, 12: 798-808, 1973.
 - 10) Kilmartin, J. V.: Interaction of hemoglobin with protons, CO₂ and 2,3-diphosphoglycerate. *Br. Med. Bull.*, 32: 209-212, 1976.
 - 11) Imai, K.: Hemoglobin Chesapeake (92 α , Arginine \rightarrow Leucine). Precise measurements and analyses of oxygen equilibrium. *J. Biol. Chem.*, 249: 7607-7612, 1974.
 - 12) Thillet, J., Garel, M. C., Blouquit, Y., Basset, P., Dreyfus, B. and Rosa, J.: Functional studies of Hb Malmö β 97 (FG 4) His \rightarrow Gln. *FEBS Lett.*, 84: 71-73, 1977.
 - 13) Shibata, S. and Iuchi, I.: Characterization of a red minor component of abnormal hemoglobin found in Hb M Hyde Park disease. *Hemoglobin*, 1(8): 829-844, 1977.
 - 14) Iuchi, I., Hidaka, K., Ueda, S. and Shibata, S.: Hemoglobin G Taichung (α 74 Asp \rightarrow His) heterozygotes found in two Japanese families. *Hemoglobin*, 2(1): 79-84, 1978.
 - 15) Iuchi, I., Ueda, S., Hidaka, K. and Shibata, S.: Hemoglobin Hoshida (β 43 (CD-2) Glu \rightarrow Gln), a new hemoglobin variant discovered in Japan. *Hemoglobin*, 2(3): 234-247, 1978.
 - 16) Ohba, Y., Miyaji, T., Matsuoka, M. and Iuchi, I.: Characterization of Hb Ube-4: alpha 116 (GH 4) Glu \rightarrow Ala. *Hemoglobin*, 2(2): 181-186, 1978.